

همسانه‌سازی پیشبر E8 گیاه گوجه‌فرنگی و بررسی بیان موقت با استفاده از سیستم اگرواینفیلتریشن

ناهید احمدی¹، حسن رهنما^{2*}، سید کمال کاظمی تبار³

¹ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

² استادیار بخش کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

³ استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: 1390/04/25، تاریخ پذیرش: 1390/12/28

چکیده

جداسازی و بررسی خصوصیات پیشبرهای اختصاصی بافت میوه، برای دستورزی و بیان هدفمند پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار است. پیشبر E8 یک پیشبر اختصاصی بافت میوه گیاه گوجه‌فرنگی بوده که طول کامل آن 2/2 kb می‌باشد. در این پژوهش بخش هسته‌ای این پیشبر به طول kb 1/1 مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آنزیم *pfu* پلیمراز، قطعه مورد نظر از روی DNA استخراج شده گوجه‌فرنگی تکثیر و همسانه‌سازی شد. پس از تعیین توالی و تایید نهایی، پیشبر E8 جایگزین پیشبر دایمی *CaMV35S* در ناقل دوگانه pBI121 گردید. پلاسمید نوترکیب با کمک شوک حرارتی به *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شد. با استفاده از روش اگرواینفیلتریشن بیان اختصاصی ژن *gus* در بافت‌های گیاه گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. اگروباکتریوم حاوی ناقل دوگانه pBI121 به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ژن *gus* در میوه‌های گوجه‌فرنگی به طور اختصاصی بیان می‌شود. از این پیشبر فعال می‌توان برای بیان اختصاصی پروتئین‌های نوترکیب در میوه‌های گیاه گوجه‌فرنگی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: اگرواینفیلتریشن، بیان موقت، پیشبر E8، گوجه‌فرنگی، *gus*.

میوه‌ها این است که این بخش‌های خوراکی را می‌توان بدون پختن و یا با حداقل فراوری مصرف نمود. به همین علت، میوه‌ها به عنوان یکی از محل‌های هدف تولید واکسن‌های نوترکیب محسوب می‌شوند. چندین پیشبر اختصاصی میوه در گوجه‌فرنگی شناسایی شده است که از آن جمله می‌توان به *E4, E8, PG* و *2A11* اشاره نمود (Coupe & Deikman, 1997; Deikman et al., 1998). این پیشبرها اغلب برای بررسی نقش اتیلن در رسیدگی میوه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پیشبر *E8* یکی از شناخته شده‌ترین پیشبرهای وابسته به رسیدگی میوه گوجه فرنگی محسوب می‌شود. ژن *E8* یکی از ژن‌های وابسته به بیوستتز اتیلن است که اولین بار توسط *Lincoln et al.* (1987, 1988) از گوجه فرنگی همسانه‌سازی شد. رونویسی ژن *E8* بوسیله اتیلن القا شده و در مراحل آغازی رسیدگی میوه فعال می‌گردد (Zhao et al., 2009). بیان ژن *E8* از نظر زمانی و مکانی در میوه‌های رسیده گوجه فرنگی تنظیم می‌شود (Deikman & Fischer, 1988). پروتئین *E8* عضوی از خانواده دی-اکسیژنازها است که در گیاهان وجود داشته و وابسته به 1-آمینوسیکلوپروپان 1-کربوکسیلیک اکسیداز (ACO) است که مرحله پایانی مسیر بیوستتزی اتیلن را کاتالیز می‌کند (Penarrubia et al., 1992; Prescott et al., 1993). *E8* و ACO همولوژی بالایی دارند، به طوری که توالی آمینو

تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته (کشاورزی مولکولی) یکی از جنبه‌های کاربردی جدید مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود. پروتئین‌های تولید شده توسط گیاهان برخلاف سیستم‌های تولید مبتنی بر سلول‌های جانوری، به علت عدم وجود عوامل بیماری‌زای مشترک انسان و دام، بسیار ایمن هستند (Larrick & Thomas, 2001). عوامل مختلفی در افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته نقش دارند که از آن جمله می‌توان به بهینه‌سازی کدونی، بیان کافی و پایدار ژن خارجی و ... اشاره نمود. با این وجود، روش، زمان و محل بیان ژن در گیاهان بوسیله مجموعه‌ای از عوامل کنترلی تنظیم می‌گردد. پیشبرها¹ به عنوان یکی از عوامل اصلی رونویسی نقش مهمی در بیان ژن دارند.

پیشبر *CaMV35S* (ویروس موزائیک گل کلم) به طور موثری سبب بیان ژن‌هایی که تحت کنترل آن قرار دارند می‌شود و به همین دلیل در مهندسی ژنتیک گیاهی کاربرد زیادی دارد (Jani et al., 2002). با این وجود، این پیشبر یک پیشبر دائمی بوده و هیچ گونه بیان اختصاصی در یک مرحله نموی یا در یک بافت خاص را سبب نمی‌شود. به همین دلیل بیان هدفمند پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته اهمیت زیادی دارد. یکی از مزایای بیان هدفمند پروتئین‌های خارجی در

¹ - Promoters

پس از شستشو در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه کشت گردید. برگ‌های جوان این گیاه در مرحله 8-10 برگی برای استخراج DNA ژنومی به روش Dellaporta *et al.* (1983) مورد استفاده قرار گرفت. از DNA استخراج شده بعنوان الگو جهت جداسازی پیشبر E8 بوسیله واکنش زنجیری پلیمرز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. برای انجام PCR از دمای 94°C برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت 4 دقیقه استفاده گردید. در ادامه 35 چرخه با شرایط زیر انتخاب شد: واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای 94°C؛ اتصال یک دقیقه در دمای 59°C و بسط یک دقیقه در دمای 72°C؛ در پایان 4 دقیقه اضافه برای بسط نهایی در 72°C در نظر گرفته شد. توالی آغازگر پیشرو 3'-aagcttctagaaatttcacgaaat-5' و توالی آغازگر برگشتی 5'-ggatcctcttttgcactgtgaatgat-3' بود. این آغازگرها بر اساس توالی ژنی موجود در سایت NCBI با شماره دسترسی AF515784 و با استفاده از نرم افزار Oligo طراحی گردید.

همسانه‌سازی پیشبر E8

به منظور تکثیر و همسانه‌سازی پیشبر E8 در ناقل دوگانه نهایی pBI121، ابتدا محصول PCR مستقیماً در ناقل T/A (ناقل pTZ57R/T) (InsTAclone™ PCR Cloning Kit# K1214،) (Fermentas) کلون گردید. انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* با استفاده از

اسیدی آنها 34% (معادل 295 باقیمانده آمینو اسیدی) با هم شباهت دارد (Deikman *et al.*, 1992). رسیدگی میوه گوجه فرنگی با افزایش میزان تولید اتیلن کنترل می‌شود (Penarrubia *et al.*, 1992). با توجه به نقش E8 به عنوان پروتئین وابسته به رسیدگی میوه گوجه فرنگی، این پروتئین می‌تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم فرایند نمو میوه گوجه فرنگی را از طریق دخالت در مسیر بیوسنتز اتیلن تحت تاثیر قرار دهد (Deikman *et al.*, 1992).

در سال‌های اخیر، پیشبر E8 به طور گسترده-ای برای اصلاح و بهبود کیفی میوه های گوجه فرنگی و همچنین بیان پروتئین‌های نو ترکیب دارویی در گوجه فرنگی‌های تراریخته مورد استفاده قرار گرفته است (Giovannoni *et al.*, 1989; Good *et al.*, 1994; Lewinsohn *et al.*, 2001; Mehta *et al.*, 2002; Garza *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007; Ramirez *et al.*, 2007).

در مطالعه حاضر، پس از همسانه‌سازی پیشبر E8 از گیاه گوجه فرنگی، بیان اختصاصی آن در بافت‌های میوه گوجه فرنگی در مقایسه با پیشبر *CaMV35s* با استفاده از روش بیان موقت اگرواینفیلتریشن مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

در این پژوهش از گیاه گوجه‌فرنگی *Lycopersicon esculentum* Mill متعلق به خانواده *Solanaceae* استفاده گردید. بذور این گیاه

ترازیخت باکتریایی در محیط انتخابی حاوی آنتی-بیوتیک کانامایسین انتخاب گردیدند. جهت تایید الحاق پیشبر در پلاسمید pBI121 آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی E8 و هضم آنزیمی توسط آنزیمهای برشی BamHI و HindIII انجام گردید. پس از تایید نهایی سازه نو ترکیب حاصل که pBI-E8-GUS نامگذاری شد (شکل 1)، انتقال این پلاسمید به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 انجام گرفت. سلولهای مستعد سویه *A. tumefaciens* به روش ذوب و انجماد¹ ترازیخت گردیدند (Sambrook & Russell, 2001) و در محیط کشت جامد حاوی کانامایسین (50 mg/l) و ریفامپسین (75 mg/l) در دمای 28°C به مدت 2 تا 3 روز کلنیها ظاهر شدند. تایید ترازیختی اگروباکتریوم با استفاده از آزمونهای PCR با آغازگرهای اختصاصی E8 انجام گردید. از اگروباکتریوم حاوی پلاسمید pBI121 به عنوان کنترل در ترازیختی استفاده شد.

بررسی بیان موقت ژن *gus* در گیاهان گوجه-

فرنگی

به منظور بررسی و ارزیابی عملکرد سازه pBI-E8-GUS در گیاهان و بررسی بیان ژن باکتریایی *gus* (که آنزیم بتاگلوکورونیداز را کد می-کند) تحت پیشبرهای E8 و *CaMV35S* در میوه گوجه فرنگی، آزمایش بیان موقت طراحی و اجرا

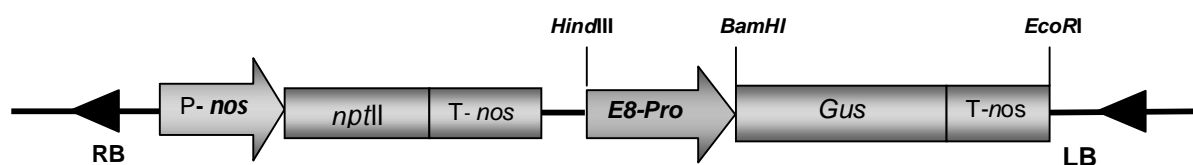
شوک حرارتی انجام گرفت. سلولهای ترازیخت حاوی پلاسمیدهای نو ترکیب در محیط LB مایع و محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین انتخاب و جهت استخراج پلاسمید به روش Miniprep مورد استفاده قرار گرفتند (Sambrook & Russell, 2001). پس از تایید حضور ژن در سازه همسانه سازی، با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیمهای BamHI و HindIII پیشبر مورد نظر از روی ژل آگارز جدا شده و با استفاده از کیت خالص سازی DNA (شرکت Roche) تخلیص گردید. به منظور تایید صحت توالی قطعه مربوط به پیشبر، پلاسمیدهای نو ترکیب پس از استخراج برای توالی یابی قطعه ورودی، به شرکت Millegene فرستاده شدند. از پرایمرهای عمومی M13 برای توالی یابی استفاده گردید. نتیجه توالی یابی در برنامه Blast نوکلئوتیدی، مورد جستجو قرار گرفت.

به منظور کلون کردن پیشبر E8 در پلاسمید pBI121 ابتدا با استفاده از آنزیمهای برشی BamHI و HindIII پیشبر *CaMV35S* از پلاسمید pBI121 خارج شده و پلاسمید خطی فاقد پیشبر *CaMV35S* با استفاده از کیت خالص سازی DNA جهت انجام واکنش اتصال آماده گردید. در مرحله بعد، پیشبر E8 جدا شده با روش فوق توسط آنزیم *T4-DNA* لیگاز به پلاسمید pBI121 خطی شده الحاق شد. ترازیختی سلولهای *E. coli* با استفاده از پلاسمید نو ترکیب به روش فیزیکی - شیمیایی انجام گردید (Sambrook & Russell, 2001). کلونهای

¹ Freeze - Thaw

سوسپانسیون باکتری اضافه شد و در دسیکاتور تحت خلاء به مدت 15 دقیقه قرار گرفتند. با حذف سریع سیستم خلاء، ورود باکتری به داخل غده‌ها تسهیل گردید. نمونه‌ها به پتری‌های حاوی کاغذ صافی منتقل شدند و به مدت 3 روز در تاریکی قرار گرفتند. بعد از پایان این مدت آزمایش هیستوشیمی ژن *gus* با استفاده از X-Gluc امکان سنجش بیان ژن را به طور اختصاصی در سلول و بافت میوه فراهم آورد. نمونه‌ها در لوله‌های حاوی محلول رنگ‌آمیزی X-Gluc برای 8-36 ساعت در دمای 37°C قرار داده گرفته و سپس در الکل 70% شستشو گردیدند (Jefferson *et al.*, 1987).

گردید. بدین منظور ابتدا اگر باکتریوم‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب pBI-E8-GUS یا pBI121 در 5 میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و 75 میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین به صورت شبانه در دمای 28°C و بر روی شیکر، کشت گردید. از اگر باکتریوم فاقد پلاسمیدهای فوق به عنوان کنترل در مورد استفاده قرار گرفت. صبح روز بعد 2 میلی‌لیتر از این کشت به 50 میلی‌لیتر در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های فوق افزوده شد و مجدداً در همان شرایط رشد ذکر شده قرار گرفت. پس از رسیدن OD_{600} به 0/5، نمونه‌های برش یافته میوه گوجه‌فرنگی به



شکل 1- سازه نوترکیب pBI-E8-GUS مورد استفاده در تراریختی موقت گیاه گوجه فرنگی.

Figure1- T-DNA region of pBI-E8-GUS vector used for transient transformation of tomato plant.

یک گیاه میزبان برای تولید واکسن‌های گیاهی شناخته شده است.

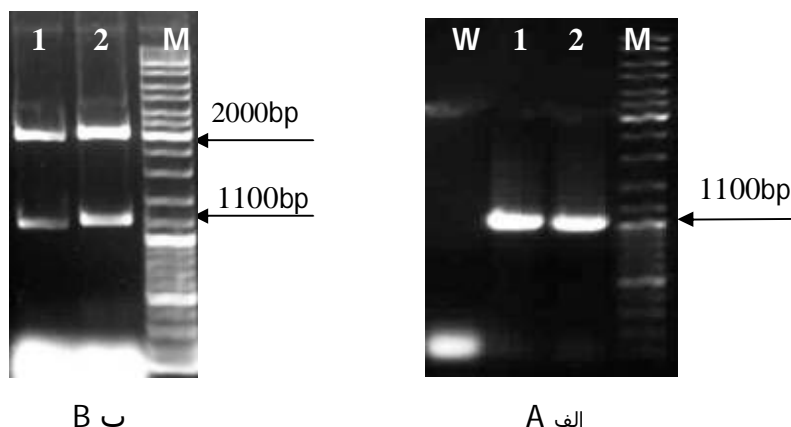
تولید کافی و بیان مناسب این پروتئین‌ها در گیاهان نیازمند شرایط و عوامل کنترلی مختلفی در روش‌های مهندسی ژنتیک است. پیشبرها یکی از مهمترین عناصر تنظیمی برای بیان ژن‌های داخلی و خارجی در یوکاریوت‌ها محسوب می‌شوند (Zhao *et al.*, 2009). به همین دلیل فعالیت و اختصاصی

نتایج و بحث

در سال‌های اخیر، گیاهان به عنوان یک مکانیسم جایگزین مناسب، ایمن و اقتصادی برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب مانند آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، آنزیم‌های صنعتی، پلیمرهای زیستی و غیره معرفی شده‌اند (Schillberg *et al.*, 2005). گوجه فرنگی هم به دلیل خوش خوراک بودن و ارزش غذایی بالا و همچنین تازه خوری به عنوان

گرفت. نتایج PCR سازه نو ترکیب جدید نشان-دهنده تکثیر قطعه 1100 جفت بازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی E8 و همچنین هضم آنزیمی آن توسط آنزیمهای برشی BamHI و HindIII حضور پیشبر E8 را در بالادست ژن gus در سازه نو ترکیب pBI-E8-GUS به اثبات رساند (شکل 4). تراریختی سلولهای مستعد سویه LBA4404 باکتری اگروباکتریوم تومفسینس با سازه نو ترکیب pBI-E8-GUS با استفاده از روش فیزیکی-شیمیایی انجام شد. کلنیهای باکتریایی حاوی سازه نو ترکیب با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی پیشبر E8 تأیید شدند. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که مطابق انتظار قطعه 1100 جفت بازی تکثیر یافته است (شکل 5). برای ارزیابی بیان اختصاصی پیشبر E8 در میوههای گیاه گوجه فرنگی، از روش تراریختی موقت با استفاده از اگروباکتریوم استفاده شد. بیان موقت ژن یک روش سریع، قابل انعطاف و تکرار پذیر برای بررسی سطح بیان آن است. در روشهای مرسوم، ارزیابی توالیهای تنظیمی نیازمند یک پروتوکل کارآمد برای تراریختی گیاه است. بنابراین، در گونههایی که تراریختی آنها مشکل و زمان بر می-باشد، یک عامل محدود کننده برای ارزیابی سریع پیشبرها خواهد بود.

بودن یک پیشبر می تواند میزان بیان ژن را در گیاهان تحت تاثیر قرار دهد. پیشبر E8 گیاه گوجه فرنگی باعث بیان اختصاصی پروتئینهای نو ترکیب در بافت میوه می شود. از زمانی که این پیشبر برای اولین بار در گوجه فرنگی چری همسانه سازی شد (Deikman et al., 1988)، مطالعات زیادی در زمینه نحوه عملکرد آن با استفاده از بیان ژنهای خارجی در گوجه فرنگی انجام شده است (Jiang et al., 2007; Ramirez et al., 2007; Zhao et al., 2009). در این پژوهش بجای استفاده از کل قطعه 2/2 کیلو بازی پیشبر E8 از قطعه هسته ای Core) 1/1 کیلو بازی آن استفاده شد. این پیشبر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و با روش PCR از ژنوم گوجه فرنگی کلون گردید (شکل 2). الحاق پیشبر بداخل پلاسمید T/A با استفاده از روش PCR ثابت شد. همچنین با استفاده از واکنش هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب توسط آنزیمهای برشی BamHI و HindIII و خروج قطعات DNA با اندازه 1100 جفت بازی، همسانه سازی پیشبر مورد تأیید قرار گرفت (شکل 2-ب). تعیین توالی و مقایسه پیشبر همسانه سازی شده با توالی موجود در NCBI نشان داد که پیشبر جدا شده 98% با توالی-های مورد جستجو شباهت دارد (شکل 3). جایگزینی پیشبر E8 با پیشبر دائمی CaMV35S در ناقل دوگانه pBI121 و ساخت سازه نو ترکیب pBI-E8-GUS (شکل 1) با استفاده از آزمونهای مختلف (PCR و هضم آنزیمی) مورد تأیید قرار



شکل 2- تایید مولکولی همسانه‌سازی پیشبر *E8* در ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T. الف- آزمون PCR کلنی‌های حاصل از واکنش اتصال ناقل pTZ57R/T و پیشبر *E8* به منظور بررسی ورود پیشبر *E8* و مشاهده باند 1100 bp. ب- هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاصل از همسانه‌سازی با استفاده از دو آنزیم *HindIII* و *BamHI* (W: کنترل منفی (آب); M: نشانگر اندازه وزن مولکولی 1 kb ladder. 1 و 2) پلاسمیدهای استخراج شده از 2 کلنی حاصل از واکنش اتصال pTZ57R/T و پیشبر *E8*.

Figure 2- Molecular analysis of *E8* promoter in pTZ57R/T cloning vector. A: PCR analysis of bacterial colony containing the product of pTZ57R/T+ *E8* ligation for the presence of 1100 bp *E8* promoter. B: Enzymatic digestion of the recombinant plasmid using *HindIII* and *BamHI*. W- Negative control (water); M- DNA molecular weight marker 1 kb ladder; 1, 2- Two sample plasmids from two bacterial colony.

نتایج حاصل از آزمایش بیان موقت پیشبر در میوه گوجه‌فرنگی در محلول رنگ آمیزی X-Gluc نشان داد که پیشبر *E8* همانند پیشبر *CaMV35S* باعث بیان ژن *gus* در میوه گوجه‌فرنگی شده است. این امر ضمن اینکه کارایی و فعالیت پیشبر *E8* را نشان می‌دهد حاکی از موفقیت روش اگرواینفیلتریشن برای میوه گوجه‌فرنگی می‌باشد. رنگ آبی بافت‌ها نشان داد که پیشبرها باعث بیان ژن *gus* شده‌اند. عدم رنگ آمیزی نمونه‌های کنترل تاکید بر

به همین دلیل، سیستم‌های بیان موقت ژن نسبت به بیان دائمی دارای مزایای فراوانی هستند که از آن جمله می‌توان به عدم نیاز به باززایی گیاه از سلول‌های تراریخته و کاهش زمان رسیدن به نتیجه بیان ژن اشاره نمود. بنابراین، سیستم‌های بیان موقت ژن ابزاری سریع و کارا برای بررسی و مقایسه فعالیت پیشبرهای مختلف در گیاهان بوده و کاربرد گسترده‌ای در زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی دارند (Agius et al., 2005; Orzaez et al., 2006; Zhao & Zhao, 2009).

احمدی و همکاران، 1390

صحت بیان ژن و عدم تاثیرپذیری نتایج از عوامل محیطی و جانبی می باشد (شکل 6).

```
>  emb|X13437.1| Tomato ethylene-responsive fruit ripening gene E8
Length=3042;Score = 1766 bits (956), Expect = 0.0;Identities = 977/998 (98%), Gaps = 0/998
(0%;Strand=Plus/Plus

Query 38  AATTTACGAAATCGGCCCTTATTCaaaaataactttaaataatgaattttaaattta 97
|||||
Sbjct 9
AATTTACGAAATCGGCCCTTATTCAAAAATAACTTTTAAATAATGAATTTTAAATTTTA 68
Query 98  agaaataatccaatgaataaatGACANGTAGCATTTTACCTAAATATTTCAACTATTT 157
|||||
Sbjct 69
AGAAATAATATCCAATGAATAAATGACATGTAGCATTTTACCTAAATATTTCAACTATTT 128
Query 158
TAATCCAATATTAATTTGTTTTATTCCCAACAATAGAAAGTCTTGTGCAGACATTTAATC 217
|||||
Sbjct 129
TAATCCAATATTAATTTGTTTTATTCCCAACAATAGAAAGTCTTGTGCAGACATTTAATC 188
Query 218
TGACTTTTCCAGTACTAAATATTAATTTTCTGAAGATTTTCGGGTTTAGTCCACAAGTTT 277
|||||
Sbjct 189
TGACTTTTCCAGTACTAAATATTAATTTTCTGAAGATTTTCGGGTTTAGTCCACAAGTTT 248
Query 278
TAGTGAGAAGTTTTGCTCAAAATTTAGGTGAGAAGTTTGATATTTATCTTTTGTTAAA 337
|||||
Sbjct 249
TAGTGAGAAGTTTTGCTCAAAATTTAGGTGAGAAGTTTGATATTTATCTTTTGTTAAA 308
Query 338
TTAATTTATCTAGGTGACTATTATTTATTTAAGTAGAAATTCATATCATTACTTTTGCCA 397
|||||
Sbjct 309
TTAATTTATCTAGGTGACTATTATTTATTTAAGTAGAAATTCATATCATTACTTTTGCCA 368
Query 398
ACTTGTAGTCATAATAGGAGTAGGTGTATATGATGAAGGAATAAACAAGTTCAGTGAAGT
457
|||||
Sbjct 369
ACTTGTAGTCATAATAGGAGTAGGTGTATATGATGAAGGAATAAACAAGTTCAGTGAAGT
428
Query 458
GATTAAAATAAAAATATAATTTAGGTGTACATCAAATAAAAACCTTAAAGTTTAGAAAGGC
517
|||||
Sbjct 429
GATTAAAATAAAAATATAATTTAGGTGTACATCAAATAAAAACCTTAAAGTTTAGAAAGGC
488
Query 518
ACCGAATAATTTTGCATAGAAGATATTAGTAAATTTATAAAAATAAAAGAAATGTAGTTG
577
|||||
Sbjct 489
ACCGAATAATTTTGCATAGAAGATATTAGTAAATTTATAAAAATAAAAGAAATGTAGTTG
548
Query 578  TCAAGTTGTCTTCTTTTTTTGGATAAAAATAGCAGTTGGCTTATGTCATTCTTTTACAA
637
|||||
Sbjct 549
TCAAGTTGTCTTCTTTTTTTGGATAAAAATAGCAGTTGGCTTATGTCATTCTTTTACAA 608
Query 638
CCTCCATGCCACTTGTCCAATTGTTGACACTTAACTAATTAGTTTGATTCATGTATGAAT 697
```



```
|||||
Sbjct 609
CCTCCATGCCACTTGTCCAATTGTTGACACTTAACTAATTAGTTTGATTCATGTATGAAT 668
Query 698
ACTAAATAATTTTTTAGGACTGACTCAAATATTTTTATATTATCATAGTAATATTTATCT 757
|||||
Sbjct 669
ACTAAATAATTTTTTAGGACTGACTCAAATATTTTTATATTATCATAGTAATATTTATCT 728
Query 758
AATTTTTAGGACCACTTATTACTAAATAATAAATTAACTACTACTATATTATTGTTGTGA 817
|||||
Sbjct 729
AATTTTTAGGACCACTTATTACTAAATAATAAATTAACTACTACTATATTATTGTTGTGA 788
Query 818
AACAAACAACGTTTTGGTTGTTATGATGAAACGTACACTATATCAGTATGAAAAATTCAAA
877
|||||
Sbjct 789
AACAAACAACGTTTTGGTTGTTATGATGAAACGTACACTATATCAGTATGAAAAATTCAAA
848
Query 878
ACGATTAGTATAAATTATATTGAAAATTTGATATTTTTCTATTCTTAATCAGACGTATTG 937
|||||
Sbjct 849
ACGATTAGTATAAATTATATTGAAAATTTGATATTTTTCTATTCTTAATCAGACGTATTG 908
Query 938
GGTTTCATATTTTAAAANNGGACTAACTTanaannnaGTTNGTTTNNAACTANTTTTG 997
|||||
Sbjct 909
GGTTTCATATTTTAAAAGGGACTAACTTAGAAGAGAAGTTTGTGTTGAACTACTTTTG 968
Query 998 NCTCTTTNNGTTCCCATTTTCNNNNNTAGATTTCAaaa 1035
|||||
Sbjct 969 TCTCTTCTTGTTCCCATTTCTCTCTTAGATTTCAAAA 1006
```

شکل 3- قسمتی از نتیجه Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی یابی شده E8، توالی ردیف اول (Query) مربوط به نتیجه حاصل از تعیین توالی قطعه E8 است و توالی دوم مربوط به توالی شماره دسترسی AF515784 است.

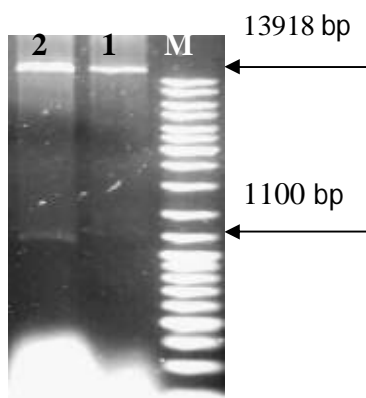
Figure 3- Blast on the sequenced E8 promoter. Query is the E8 promoter isolated from tomato plant; subject is the sequence of accession number AF515784.

کنند. در پژوهشی Orzaez *et al.* (2006) بیان موقت را برای آنالیز عملکرد ژن در میوه گوجه-فرنگی توسعه داده و مشخص کردند که تزریق سوسپانسیون آگروباکتریوم با استفاده از سوزن سرنگ (آگرواینجکشن) منجر به نفوذ بهتر باکتری در میوه می شود. بیان دائمی ژن *gus* تحت کنترل پیشبر *E8* 2/2 bp در گیاه گوجه فرنگی نشان داد

بیان موقت ژن تجزیه کننده آفت کش ارگانوفسفوری (*opd*) تحت کنترل پیشبر *E8* در گیاه گوجه فرنگی با روش آگرواینفیلتریشن منجر به بیان اختصاصی آن در میوه های این گیاه شد (Zhao & Zhao, 2009). در این پژوهش محققان همچنین موفق شدند با همان روش ژن *gus* را تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* در میوه های گوجه فرنگی بیان

(1996). در پژوهش حاضر بجای قطعه 2/2 kb پیشبر E8 از قطعه 1/1 bp آن استفاده شد. نتایج نشان داد که قطعه پیشبری مورد استفاده هم می-تواند بیان ژن gus را در میوه‌های رسیده القا نماید.

که بیان ژن gus در میوه‌های نارس تنها در سلول-های پارانسیم آوندی میوه‌ها صورت می‌گیرد در حالی که در میوه‌های رسیده گوجه فرنگی، کل میوه ژن gus را بیان می‌کند (Kniesl & Deikman,)



شکل 4- هضم آنزیمی پلاسمید های نو ترکیب pBI-E8-GUS به منظور تایید ورود پیشبر E8 . M- نشانگر اندازه مولکولی 1 kb ladder؛ 1 و 2- هضم آنزیمی دو نمونه پلاسمید pBI-E8-GUS با دو آنزیم *HindIII* و *BamHI*.

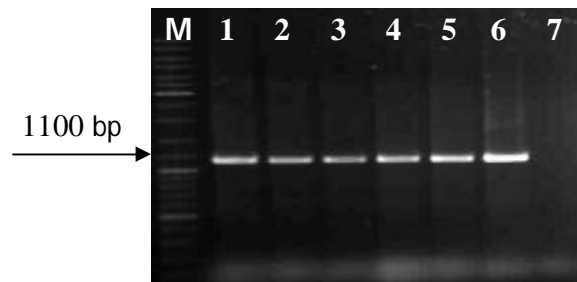
Figure 4- Enzymatic digestion of pBI-E8-GUS. M-DNA molecular weight marker 1kb ladder; 1,2- Plasmid digested with *HindIII* and *BamHI*

به ژن HBsAg متصل و به *Nicotiana tabacum* منتقل نمودند. بیان ژن HBsAg تحت کنترل پیشبر E8، 1/1 kb در بافتهای برگ، گل، دانه توتون مشاهده نشد ولی تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* در توتون تراریخته بیان شدند. با سنجش الیزا ثابت شد که پیشبر 1/1 kb، E8 قادر به بیان ژن خارجی در میوه‌های رسیده گوجه فرنگی تراریخته می‌باشد و در برگ، گل و میوه نارس بیان نمی‌شود. نتایج نشان داد که این پیشبر نه تنها در اندام ویژه، بلکه در گونه‌های خاصی هم عمل می‌کند. همانند

در پژوهش‌هایی Zhou et al. (2003) و نیز Wang et al. (2003) پیشبر E8 را همسانه سازی و توالی‌یابی کردند. آنها نشان دادند که امکان استفاده از این پیشبر در تولید واکسن خوراکی در گوجه فرنگی تراریخته و همچنین هلوی تراریخته وجود دارد. (He et al. (2007) پیشبر E8 ویژه میوه گوجه فرنگی را در بیان آنتی ژن واکسن ارزیابی کردند. آنها پیشبر 1/1 kb و 2/2 kb را از *Lycopersicon esculentum cv. Jinfeng* جدا و توالی‌یابی کردند. پیشبر E8 و پیشبر *CaMV35S* را

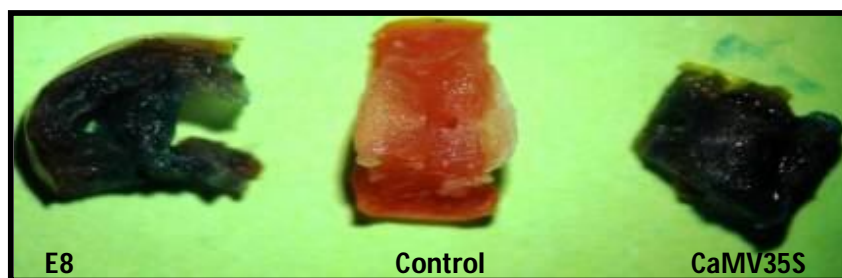
بیان ژن ضروری باشند (Deikman *et al.*, 1998). بنابراین، از این پیشبرمی‌توان برای تولید هدفمند پروتئین‌ها و واکسن‌های نو ترکیب در گوجه فرنگی استفاده کرد.

گزارش ارائه شده توسط Jiang *et al.* (2007)، نتایج این پژوهش هم نشان داد که قطعه 1/1 kb پیشبر E8 هم می‌تواند بیان هدفمند ژن در میوه گوجه فرنگی را سبب شود. بنظر می‌رسد که بقیه بخش‌های پیشبر 2/2 کیلو بازی شاید برای افزایش



شکل 5- تایید انتقال پلاسمید نو ترکیب pBI-E8-GUS به *A. tumefaciens* سویه LBA4404 با استفاده از PCR. 1 - نشانگر اندازه مولکولی 1 kb ladder، 2-7، کلونی‌های حاوی سازه نو ترکیب pBI-E8-GUS و مشاهده باند 1100 bp -8 کنترل منفی (آب).

Figure 5- PCR analysis of *A. tumefaciens* LBA4404 containing pBI-E8-GUS recombinant vector using E8 primers. 1- DNA Molecular weight marker 1 kb ladder; 2-7- Different agrobacterial colony containing pBI-E8-GUS. 8- Negative control (water).



شکل 6- بیان موقت ژن *gus* با استفاده از آگرواینفیلتریشن برای پیشبرهای E8 و CaMV35S و آگروباکتریوم بدون پلاسمید نو ترکیب (کنترل).

Figure 6- Transient expression of *gus* gene under the control of E8 and CaMV35S promoter using Agroinfiltration system. Control- agroinfiltration using agrobacterium free from plasmids

- Agius F, Amaya I, Botella MA, Valpuesta V (2005). Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. *Journal of Experimental Botany* 56: 37-46.
- Coupe SA, Deikman J (1997). Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 50 flanking regions of two fruit-ripening genes. *Plant Journal* 11: 1207–1218.
- Deikman J, Kline R, Fischer RL (1992). Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiology* 100: 2013–7.
- Deikman J, Xu R, Kneissl ML, Ciardi JA, Kim KN, Pelah D (1998). Separation of *cis* elements responsive to ethylene, fruit development, and ripening in the 50 flanking region of the ripening-related *E8* gene. *Plant Molecular Biology* 37: 1001–1011.
- Deikman J, Fischer RL (1988). Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato; *EMBO Journal* 7: 3315–3320.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Garza RD, Quinlivan EP, Klaus SMJ, Basset GJC, Gregory JF, Hanson AD (2004). Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis; *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America* 101 13720–13725.
- Giovannoni J, DellaPenna D, Bennett AB, Fischer RL (1989). Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell* 1: 53–63.
- Good X, Kellogg JA, Wagoner W, Langhoff D, Matsumura W, Bestwick RK (1994). Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Molecular Biology* 26: 781–790.
- He ZM, Jiang XL, Qi Y, Luo DQ (2007). Assessment of the utility of the tomato fruit-specific *E8* promoter for driving vaccine antigen expression; *Genetica* 133: 207–214.
- Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haq QM, Singh Y, Sharma AK, Tyagi AK (2002). Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Research* 11: 447–454.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Jiang XL, He ZM, Peng ZQ, Qi Y, Chen Q, Yu SY (2007). Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Research* 16:169–75.
- Kneissl ML, Deikman J (1996). The tomato *E8* gene influences ethylene biosynthesis in fruit but not in flowers; *Plant Physiology* 112: 537–547.
- Larrick JW, Thomas DW (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 411–418.
- Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson J, Matsui K, Tadmor Y, Nam KH, Amar O, Lastochkin E, Larkov O, Ravid U, Hiatt W, Gepstein S, Pichersky E (2001). Enhanced levels of the aroma and flavor compound *S*-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiology* 127: 1256–1265.

- Lincoln JE, Cordes S, Read E, Fischer RL (1987). Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit ripening. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 2793–2797.
- Lincoln JE, Fischer RL (1988). Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Molecular and General Genetic* 212: 71–75.
- Mehta RA, Cassol T, Li N, Ali N, Handa AK, Mattoo AK (2002). Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life; *Nature Biotechnology* 20: 613–618.
- Orzea D, Mirabel S, Wieland WH, A Granell A (2006). Agroinjection of tomato fruits : a total for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology* 140: 3-11.
- Penarrubia L, Aguilar M, Margossian L, Fischer RL (1992). An antisense gene stimulates ethylene hormone production during tomato fruit ripening; *Plant Cell* 4: 681–687.
- Prescott AG (1993) A dilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet. *Journal of Experimental Botany* 44: 849–861.
- Ramirez YJ, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Donayre Torres AJ, Olivera Flores MT, Giacca M, Lim MAG (2007). Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. *Clinical and Vaccine Immunology* 14: 685–92.
- Sambrook J, Russell DW (2001). Rapid isolation of yeast DNA. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schillberg S, RTwyman RM, Fischer R (2005). Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants- technology assessment. *Vaccine* 23: 1764-1769.
- Wang J, Oard JH (2003). Rice Ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. *Plant Cell Reports* 22: 129–34.
- Zhao L, Lu L, Zhang L, Wang A, Wang N, Liang Z, Lu X, Tang K (2009). Molecular evolution of *E8* promoter in tomato and some of its relative wild species. *Journal of Biosciences* 34: 71-83.
- Zhou XH, Chen XG, Zhang XD., Wang YN, Li L, Xi JF, Hu JJ (2003). Cloning and sequence analysis of tomato fruit-specific *E8* promoter from *Lycopersicon esculentum* (Zhongshu No.5). *Biological sciences* 23: 25-8.
- Zhao JH, Zhao DG (2009). Transient expression of organophosphorus hydrolase to enhance the degrading activity of tomato fruit on coumaphos. *Journal of Zhejiang University Science B* 10:142-146.

Cloning of tomato *E8* promoter and its analysis in transient assays using Agro-infiltration system

Ahmadi N.¹, Rahnama H.*², Kazemi Tabar S.K.³

¹ MSc student, Department of Biotechnology, Faculty of agriculture and natural resources of Sari

² Assistant Professor, Department of Plant tissue culture and gene transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. Karaj, Iran

³ Assistant Professor, Department of agronomy and plant breeding, Faculty of agriculture and natural Resources of Sari.

Abstract

Isolation and characterization of fruit specific promoters is important for manipulation and targeted expression of recombinant proteins in plants. *E8* is a fruit specific promoter with 2.2 kb length. In this study, a 1.1 kb core part of *E8* promoter was used. The amplification of the *E8* promoter was conducted using specific primers and *pfu* polymerase by Polymerase Chain Reaction (PCR). After sequencing of *E8* promoter for its confirmation, the CaMV35S promoter in pBI121 binary vector replaced by *E8* promoter. The recombinant plasmid pBI-E8-GUS was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by using freeze-thaw method. The specific expression of *gus* gene in tomato tissue was evaluated using Agro-infiltration method. *Agrobacterium* harboring pBI121 was used as control. The results showed that *gus* gene can express specifically in tomato fruits under the control of *E8* promoter. Therefore, *E8* promoter can be used for tissue specific expression of recombinant protein in the fruit of tomato plants.

Key words: Agro-infiltration, *E8* promoter, Tissue specific, Tomato, Transient expression,

* Corresponding Author: Rahnama H.

Tel: 026-32703536

Email: hrahnama@abrii.ac.ir